



39

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07J 41/00, C07C 237/22, A61K 9/127, C12N 15/63		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/31934 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. September 1997 (04.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00973 (22) Internationales Anmeldedatum: 28. Februar 1997 (28.02.97) (30) Prioritätsdaten: 196 07 686.2 29. Februar 1996 (29.02.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): CHEMI- CON LABORATORIES GMBH [DE/DE]; Margaretens- strasse 16a, D-81373 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÖNIG, Stephan [DE/DE]; Waldweg 16, D-85567 Grafing (DE). KLÖSEL, Roland [DE/DE]; Dülferstrasse 26a, D-80933 München (DE). (74) Anwalt: FORSTMAYER, Dietmar; Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 24. Dezember 1997 (24.12.97)	
(54) Title: NOVEL METABOLIZABLE LIPOPOLYAMINES, THEIR PREPARATION AND THEIR USE (54) Bezeichnung: NEUE METABOLISIERBARE LIPOPOLYAMINE, DEREN DARSTELLUNG UND ANWENDUNG (57) Abstract The invention concerns novel metabolizable lipopolyamines (including their salts), their preparation and their use. These novel compounds enable biologically active materials, such as DNA, antisense DNA/RNA, ribozymes, antiviral substances, proteins and peptides, for example, to be incorporated in eucaryotic cells. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft neue metabolisierbare Lipopolyamine (einschließlich deren Salze), sowie deren Herstellung und Anwendung. Diese neuen Verbindungen ermöglichen zum Beispiel die Einschleusung von biologisch aktiven Materialien, wie zum Beispiel von DNA, Antisense-DNA/RNA, Ribozymen, antiviralen Wirkstoffen, Proteinen und Peptiden in eukaryotische Zellen.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LT	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/00973

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07J41/00 C07C237/22 A61K9/127 C12N15/63		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07J C07C		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG J ET AL: "SYNTHESIS OF MULTIVALENT CATIONIC CHOLESTERYL LIPIDS FOR USE AS GENE DELIVERY VEHICLES" PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE BIOACTIVE MATERIALS, no. 22, 1995, page 414/415 XP000607562 see the whole document ---	1-3,10, 11
X	WO 96 01841 A (GILEAD SCIENCES INC ;GLAXO WELLCOME INC (US)) 25 January 1996 see examples 17,18 ---	1-3,10, 11
X	WO 96 01840 A (GILEAD SCIENCES INC) 25 January 1996 see examples 17,18 --- ---	1-3,10, 11
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 November 1997		Date of mailing of the international search report 18. 11. 97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sánchez García, J.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter 1st Application No

PCT/EP 97/00973

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 19, 10 May 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 192093, BRUNNER H ET AL: "Synthesis and antitumor activity of platinum(II) complexes of cholesterol derivatives" page 995; column 1; XP002032045 see abstract & BULL. SOC. CHIM. BELG., vol. 101, no. 11, 1992, pages 935-943, ---	1,3
P,X	WO 96 18372 A (GENZYME CORP) 20 June 1996 see figure 1C ---	1,3,10, 11
P,X	WO 96 40265 A (UNIV CALIFORNIA) 19 December 1996 see figures 22-24 ---	1-3,10, 11
P,A	see figures 19,20 ---	4-9
P,X	WO 96 41873 A (UNIV CALIFORNIA) 27 December 1996 see figures 22-24 ---	1-3,10, 11
P,A	see figures 19,20 ---	4-9
P,X	WO 96 40264 A (UNIV CALIFORNIA) 19 December 1996 see page 4-9; figures 10-12 ---	1-3,10, 11
P,A	see figures 5,6 ---	4-9
A	REMY, JEAN-SERGE ET AL: "Gene Transfer with a Series of Lipophilic DNA-Binding Molecules" BIOCONJUGATE CHEM. (1994), 5(6), 647-54 CODEN: BCCHES;ISSN: 1043-1802, 1994, XP000484178 see page 650 - page 651 -----	1,2,4-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/00973

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1- Claims 1,2,10-11 (partly)
3 (in full)
- 2- Claims 1,2,10-11 (partly)
4-9 (in full)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/00973

Claims 1, 2, 10-11 (in part)
3 (in full)

Compounds of general formula (I) wherein R_1 is a sterine group of formula (II), a method of preparing them, and liposome formulations thereof.

Claims 1, 2, 10-11 (in part)
4-9 (in full)

Compounds of general formula (I) wherein R_1 is a group of formula (III), a method of preparing them, and liposome formulations thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/00973

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9601841 A	25-01-96	WO 9601840 A	25-01-96
WO 9601840 A	25-01-96	WO 9601841 A	25-01-96
WO 9618372 A	20-06-96	US 5650096 A	22-07-97
		AU 4516196 A	03-07-96
		EP 0799059 A	08-10-97
WO 9640265 A	19-12-96	AU 5938196 A	30-12-96
WO 9641873 A	27-12-96	AU 5938296 A	09-01-97
WO 9640264 A	19-12-96	AU 6024896 A	30-12-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/00973

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C07J41/00 C07C237/22 A61K9/127 C12N15/63		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C07J C07C		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WANG J ET AL: "SYNTHESIS OF MULTIVALENT CATIONIC CHOLESTERYL LIPIDS FOR USE AS GENE DELIVERY VEHICLES" PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE BIOACTIVE MATERIALS, Nr. 22, 1995, Seite 414/415 XP000607562 siehe das ganze Dokument ---	1-3,10, 11
X	WO 96 01841 A (GILEAD SCIENCES INC ;GLAXO WELLCOME INC (US)) 25.Januar 1996 siehe Beispiele 17,18 ---	1-3,10, 11
X	WO 96 01840 A (GILEAD SCIENCES INC) 25.Januar 1996 siehe Beispiele 17,18 ---	1-3,10, 11
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. November 1997		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 18. 11. 97
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Sánchez García, J.M.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 19, 10.Mai 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 192093, BRUNNER H ET AL: "Synthesis and antitumor activity of platinum(II) complexes of cholesterol derivatives" Seite 995; Spalte 1; XP002032045 siehe Zusammenfassung & BULL. SOC. CHIM. BELG., Bd. 101, Nr. 11, 1992, Seiten 935-943, ---	1,3
P,X	WO 96 18372 A (GENZYME CORP) 20.Juni 1996 siehe Abbildung 1C ---	1,3,10, 11
P,X	WO 96 40265 A (UNIV CALIFORNIA) 19.Dezember 1996 siehe Abbildungen 22-24 P,A siehe Abbildungen 19,20 ---	1-3,10, 11
P,X	WO 96 41873 A (UNIV CALIFORNIA) 27.Dezember 1996 siehe Abbildungen 22-24 P,A siehe Abbildungen 19,20 ---	4-9
P,X	WO 96 40264 A (UNIV CALIFORNIA) 19.Dezember 1996 siehe Seite 4-9; Abbildungen 10-12 P,A siehe Abbildungen 5,6 ---	1-3,10, 11
A	REMY, JEAN-SERGE ET AL: "Gene Transfer with a Series of Lipophilic DNA-Binding Molecules" BIOCONJUGATE CHEM. (1994), 5(6), 647-54 CODEN: BCCHES;ISSN: 1043-1802, 1994, XP000484178 siehe Seite 650 - Seite 651 -----	4-9
		1,2,4-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/ 00973

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich _____
2. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich _____
3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

- | | |
|---------------------|-----------------------|
| 1 - Patentansprüche | 1,2,10-11 (teilweise) |
| | 3 (insgesamt) |
| 2 - Patentansprüche | 1,2,10-11 (teilweise) |
| | 4-9 (insgesamt) |

1. ☒ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/ EP 97/00973

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Patentansprüche 1,2,10-11 (teilweise)
3 (insgesamt)

Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wo R1 eine Steringruppe der Formel (II) darstellt, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und Liposomformulierungen davon.

Patentansprüche 1,2,10-11 (teilweise)
4-9 (insgesamt)

Verbindungen der allgemeinen Formel (I), wo R1 eine Gruppe der Formel (III) darstellt, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und Liposomformulierungen davon.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung ..., die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/00973

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9601841 A	25-01-96	WO 9601840 A	25-01-96
WO 9601840 A	25-01-96	WO 9601841 A	25-01-96
WO 9618372 A	20-06-96	US 5650096 A	22-07-97
		AU 4516196 A	03-07-96
		EP 0799059 A	08-10-97
WO 9640265 A	19-12-96	AU 5938196 A	30-12-96
WO 9641873 A	27-12-96	AU 5938296 A	09-01-97
WO 9640264 A	19-12-96	AU 6024896 A	30-12-96



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07J 41/00, C07C 237/22, A61K 9/127, C12N 15/63		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/31934 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. September 1997 (04.09.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00973 (22) Internationales Anmeldedatum: 28. Februar 1997 (28.02.97) (30) Prioritätsdaten: 196 07 686.2 29. Februar 1996 (29.02.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): CHEMI- CON LABORATORIES GMBH [DE/DE]; Margareten- strasse 16a, D-81373 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÖNIG, Stephan [DE/DE]; Waldweg 16, D-85567 Grafing (DE). KLÖSEL, Roland [DE/DE]; Dölferstrasse 26a, D-80933 München (DE). (74) Anwalt: FORSTMEYER, Dietmar, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: NOVEL METABOLIZABLE LIPOPOLYAMINES, THEIR PREPARATION AND THEIR USE (54) Bezeichnung: NEUE METABOLISIERBARE LIPOPOLYAMINE, DEREN DARSTELLUNG UND ANWENDUNG (57) Abstract <p>The invention concerns novel metabolizable lipopolyamines (including their salts), their preparation and their use. These novel compounds enable biologically active materials, such as DNA, antisense DNA/RNA, ribozymes, antiviral substances, proteins and peptides, for example, to be incorporated in eucaryotic cells.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft neue metabolisierbare Lipopolyamine (einschließlich deren Salze), sowie deren Herstellung und Anwendung. Diese neuen Verbindungen ermöglichen zum Beispiel die Einschleusung von biologisch aktiven Materialien, wie zum Beispiel von DNA, Antisense-DNA/RNA, Ribozymen, antiviralen Wirkstoffen, Proteinen und Peptiden in eukaryotische Zellen.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Neue metabolisierbare Lipopolyamine, deren Darstellung und Anwendung

5 Positiv geladene Lipide (J.P.Behr, Bioconjugate Chem. 5, 382-389 (1994)) werden in Form von Liposomen oder als solche zur Einschleusung von biologisch aktiven Substanzen wie Peptiden, Proteinen, antiviralen Wirkstoffen insbesondere aber DNA, RNA, Antisense-DNA/RNA oder Ribozymen in eukariotische Zellen (zum Beispiel Säuger-, Pflanzen-, Insekten-Zellen) eingesetzt. Lipopolyamine sind eine spezielle Klasse von
10 kationischen Lipiden, die vergleichsweise hervorragende Transfektionseigenschaften zeigen. Unter Transfektion versteht man die Einschleusung von Erbmaterial in eukariotische Zellen.

Die Notwendigkeit DNA (zum Beispiel Plasmide, Cosmide, einzelsträngig oder doppelsträngig), RNA oder verwandte Stoffklassen, wie Antisense-DNA/RNA oder Ribozyme
15 in eukariotische Zellen einzuführen, um beispielsweise erfolgreich Gentherapie betreiben zu können, führte zur Entwicklung einer Vielzahl von Transfektionsmethoden. Zur Einführung von Nukleinsäuren in eukariotische und insbesondere in Säugerzellen ist eine Vielzahl von Verfahren, wie zum Beispiel die CaPO_4 -Präzipitationsmethode, die DEAE-Dextran-Methode, Methoden, welche die rezeptorvermittelte Endocytose nutzen, Elektroporation, Mikroinjektion und Verfahren, die virale Capside als DNA-Carrier benutzen, bekannt. Eine weitere Methode wird Lipofektion (P.L.Felgner et al.,
20 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 7413 (1987)) genannt. Diese nützt die Tatsache, daß synthetische kationische Lipide in Form von Liposomen oder als solche mit der negativ geladenen DNA Komplexe bilden. Stellt man die Mengenverhältnisse von DNA und kationischem Lipid so ein, daß die resultierenden Komplexe eine positive Nettoladung tragen, so besitzen sie eine hohe Affinität zu der negativ geladenen Membranoberfläche eukariotischer Zellen. Treffen solche DNA/Lipid-Komplexe auf Zellen, so kommt es zu einer Einschleusung des genetischen Materials in die Zelle. Der genaue Mechanismus, wie die DNA in die Zellen gelangt, ist noch weitgehend unbekannt, man vermutet jedoch, daß es entweder zu einer Fusionierung der kationischen Lipide mit der anionischen Zellmembran bei gleichzeitiger Ausschüttung der DNA in das Zellinnere kommt,
25 oder daß die DNA/Lipid-Komplexe als ganzes über einen natürlichen Transportmecha-

nismus der Zellen, die sogenannte Endozytose, in die Zelle gelangen und danach die DNA freigesetzt wird.

Liposomen sind kugelartige Anordnungen von Lipiden in wäßrigen Lösungen mit „Bilayer-Struktur“ und werden typischerweise in drei Klassifikationen eingeteilt (siehe

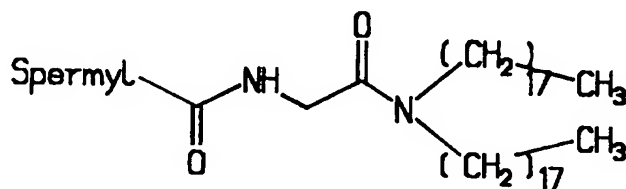
- 5 N.Y. Academy Sciences Meeting: „Liposomes and their use in Biology and Medicine“ von Dezember 1977): Multilamellare Vesikel (MLV, bis zu 10000 nm), kleine unilamellare Vesikel (SUV, 20-50 nm) und große unilamellare Vesikel (LUV, 600-30000 nm). Eine Reihe von Herstellungsmethoden für Liposomen ist bekannt und in „Liposome Technology“ (Gregoriadis, CFC Press, N.Y. 1984) ,in „Liposomes“ (Ostro, Marcel Dekker, N.Y. 1987) oder in Übersichtsartikeln von Lichtenberg et al. (Methods Biochem. Anal. 33, 337-462, 1988), Pagano und Weinstein (Ann. Rev. Biophysic. Bioeng. 7, 435-68, 1978), oder Szoka und Papahadjopoulos (Ann. Rev. Biophysic. Bioeng. 9, 467-508, 1980) beschrieben. Bekannte Methoden sind beispielsweise die „reverse-phase evaporation“-Methode und die Extrusionsmethode, bei der eine Lipidlösung durch eine
- 15 mikroporöse Membran gepresst wird.

Liposomen werden typischerweise auch auf folgendem Weg hergestellt: Die Lipide werden in einem organischen Lösungsmittel aufgenommen. Durch Verdampfen des Lösungsmittels unter einem Strom von Stickstoff wird an der Glasgefäßwand ein dünner Lipidfilm erzeugt. Zugabe von Wasser oder wässriger Pufferlösung hydratisiert diesen

20 Film. Die erhaltene Lösung wird zuletzt mit Ultraschall behandelt.

- Kationische Lipide gewinnen zunehmende Bedeutung in der Gentherapie. Dabei werden in vivo mit verschiedenen Verfahren Körperzellen transfektiert, indem Komplexe aus Carrier und DNA intradermal, intramuskulär, intraperitoneal, intravenös, subkutan, intranasal, in Liquorräume oder direkt in Tumore verabreicht werden oder Körperzellen
- 25 entnommen, transfektiert und wieder reimplantiert werden. Eine in diesem Zusammenhang favorisierte Methode war bis vor einiger Zeit die Einbringung des genetischen Materials durch virale Carrier. Diese Methode besitzt jedoch die Gefahr der Rückmutation zu einem pathogenen Virus. Desweiteren wird die eingeschleuste DNA stabil in das Erbgut eingebaut, so daß eine Steuerung der Therapie oder eine Rückführung der Zellen
- 30 in ihren ursprünglichen Zustand nicht mehr möglich ist. Zudem besitzen virale Carrier Restriktionen bezüglich der Größe der einzuschleusenden DNA. Modifizierte DNA oder RNA wird durch Viren nicht übertragen. Außerdem können nur sich teilende Zellen auf diesem Wege transfektiert werden.

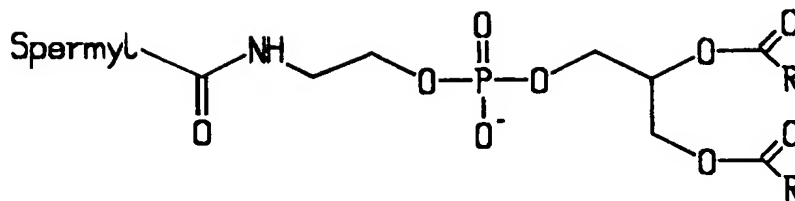
- Die Transfektion mit kationischen Lipiden ist diesen Restriktionen hingegen nicht unterworfen. Die Transfektion verläuft in der Regel transient, das heißt die transfektierte DNA oder RNA wird nur für eine bestimmte Zeit exprimiert, da sie nicht in das Erbgut eingebaut wird, sondern nur ins Cytoplasma transportiert und dort durch Nukleasen mit der Zeit abgebaut wird. Auf diese Weise kann Gentherapie dosiert und reversibel gemacht werden. Restriktionen bezüglich der Größe der DNA bestehen nicht und modifizierte DNA oder RNA kann mittels kationischer Lipide in Zellen eingeschleust werden. Auch sich nicht teilende Zellen, wie zum Beispiel Nervenzellen, können durch kationische Lipide transfektiert werden.
- 10 Während die in vivo-Anwendung von Mikroinjektion und Elektroporation aus Verfahrensgründen nicht möglich erscheinen, besitzen die CaPO_4 - und DEAE-Dextran-Methoden verglichen mit der Lipofektion eine schlechtere Transfektionseffizienz.
- Unter den kationischen Lipiden gibt es eine Klasse, die die bekannt hohe Affinität zwischen Spermin und DNA zur Transfektion ausnützt, in dem das bei einem physiologischen pH-Wert positiv geladene Spermin mit einem hydrophilen Rest, in manchen Fällen über einen Spacer, verknüpft wird. Spermin bildet besonders stabile Komplexe mit DNA und ähnlichen Verbindungen, indem es über Wasserstoffbrückenbindung in der Furche der DNA gebunden wird.
- 15 Die ersten solchen Liposperminderivate wurden von Behr, J. P. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986; EP 0394111 synthetisiert. Dabei verknüpften sie Carboxyspermin über einen Spacer mit zwei unterschiedlichen hydrophilen Resten. Die Struktur des dabei erhaltenen 5-Carboxyspermylglycindiocetylamid (DOGS) ist:



25

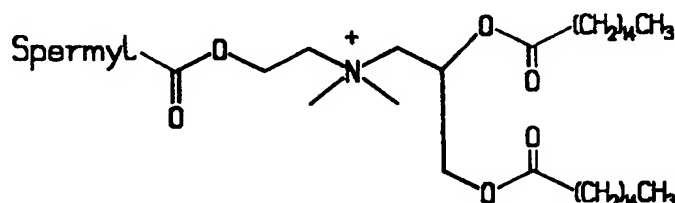
DOGS ist als Transfectam™ (Promega) kommerziell erhältlich.

Die zweite von Behr et al. entwickelte Verbindung ist Dipalmitoylphosphatidylethanolamin-5-carboxyspermylamid (DPPES):



wobei $R = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}$ ist.

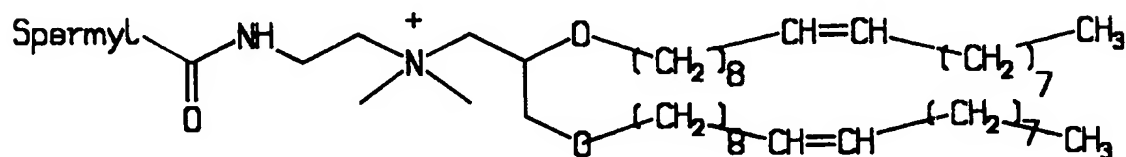
- 5 Ein weiteres Liposperminderivat wird von P.L.Felgner et al. in WO 9116024 unter der Bezeichnung L-Spermin-5-carboxyl-3-(DL-1,2-dioleoyldimethylaminopropyl-β-hydroxyethyl-amin) beansprucht. In der Patentschrift beschrieben ist jedoch L-Spermin-5-carboxyl-3-(DL-1,2-dipalmitoyl-dimethylaminopropyl-β-hydroxyethylamin):



10

Gebeyehu, G. et al. beschreiben in WO 9405624 die Verbindung N-[N-(5-Carboxyspermyl)aminoethyl] N, N-dimethyl-2,3-bis (9-octadecenyl-oxy) 1-propanammonium tetra(trifluoracetat), welches kommerziell als Lipofectamin™ (Gibco-BRL:Life Technologies Inc.) erhältlich ist.

15



x 4 TFA

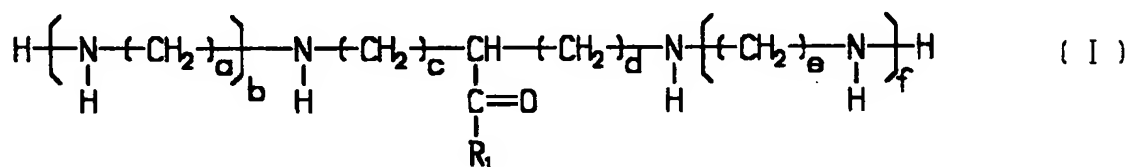
- 20 Trotz großer Fortschritte auf diesem Gebiet, verbleibt ein Bedarf an einer größeren Auswahl an kationischen Lipiden. Bis heute wurde kein kationisches Lipid gefunden, daß mit allen Zelltypen befriedigende Ergebnisse liefert. Da verschiedene Zelltypen sich

in ihrer Membranzusammensetzung unterscheiden, ist es nicht verwunderlich, daß verschiedene Kompositionen von Lipiden und verschiedenartige Lipidtypen für eine effektive Transfektion unterschiedlicher Zellen benötigt werden.

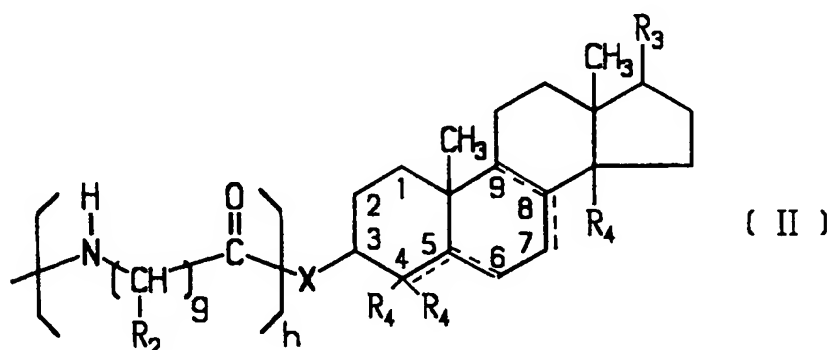
- Von besonderer Bedeutung ist die Metabolisierbarkeit und Toxizität der Lipide und ihrer Abbauprodukte. Diese sind die bestimmenden Faktoren für die Verträglichkeit der Lipide für die Zellen. Die Metabolisierbarkeit wird hauptsächlich durch die in den Lipiden enthaltenen chemischen Verknüpfungen bestimmt.

- Da über den eigentlichen Transfektionsschritt bis heute noch wenig bekannt ist, ist die Entwicklung von neuen kationischen Lipiden weitgehend empirisch. Wichtige zu beachtende Punkte für das Design solcher Lipide sollte ihre Toxizität gegenüber den zu transfektierenden Zielzellen, desweiteren ihre Stabilität, Metabolisierbarkeit, die Möglichkeit einer in vivo-Anwendung und einfache Synthesewege sein.

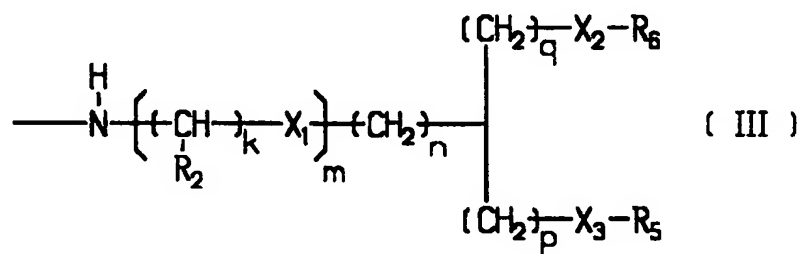
- Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verbindungen der allgemeinen Formel I:



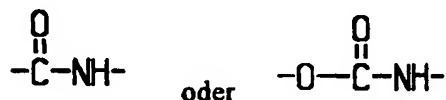
- die bei Vorhandensein eines Asymmetriezentrums in der D-, L- oder DL-Form vorliegen, einschließlich ihrer Salze, wobei a, b, c, d, e und f unabhängig voneinander 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 sind und wobei a nur dann 0 ist, wenn b 0 ist und e nur dann 0 ist, wenn f 0 ist, R₁ ein Rest der allgemeinen Formel II ist:



- in welcher g 0,1,2,3,4,5 oder 6 ist, h 0,1,2 oder 3 ist, wobei g 0 ist, wenn h 0 ist und h 1 ist, wenn g 0 ist, X -O- oder -NH-, alle Positionen der Steroid-Substituenten α - oder β -konfiguriert sein können, die C-Atome 4 und 5 und/oder 5 und 6 und/oder 7 und 8 und/oder 8 und 9 über eine Doppelbindung verknüpft sind, mit der Maßgabe, daß die C-Atome 5 und 8 neben Einfachbindungen jeweils über höchstens eine Doppelbindung mit benachbarten Atomen verknüpft sind, R_2 und R_3 unabhängig voneinander Wasserstoff oder ein verzweigter oder unverzweigter Alkyl- oder ein verzweigter oder unverzweigter Alkenyl- oder ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Aralkylrest sind, R_4 H oder Methyl ist,
- 10 oder R_1 ein Rest der allgemeinen Formel III ist:



- 15 wobei alle chirale Zentren in D-, L- oder als Racemat vorliegen, m 0,1,2 oder 3 ist, k 0,1,2,3,4,5 oder 6 ist, wobei k 0 ist, wenn m 0 ist und m 1 ist, wenn k 0 ist, n, p und q unabhängig voneinander 0,1,2,3,4,5 oder 6 sind, R_2 wie vorstehend definiert ist, X_1 , X_2 , und X_3 unabhängig voneinander



- 20 sind,

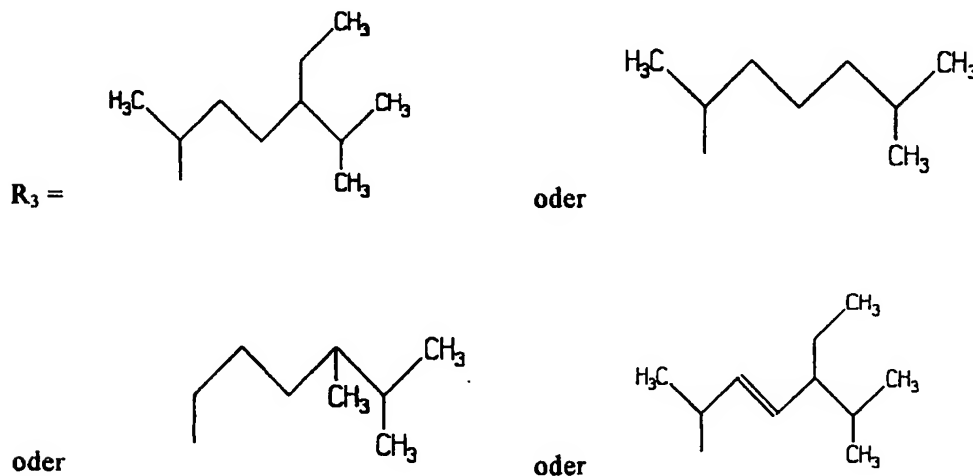
R_5 und R_6 unabhängig voneinander verzweigte oder unverzweigte Alkyl- oder Alkenylreste mit 5-30 Kohlenstoffatomen sind.

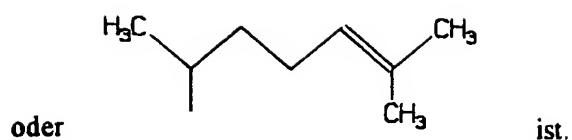
25

- Die erfindungsgemäßen Lipide enthalten also Polyamine als DNA-affine Kopfgruppen, die gegebenenfalls über einen Spacer an Lipidstrukturen gebunden sind. Die Kopfgruppe wird dabei über biologisch abbaubare Verbindungen an das Restmolekül gebunden, welches wiederum aus biologisch abbaubaren Verbindungen aufgebaut ist. Eine Vielzahl der erfindungsgemäßen Lipide läßt sich aus nicht oder nur wenig toxischen Verbindung einfach durch Aufbau über Amid- und Urethanverknüpfungen herstellen. Damit erreicht man eine Kombination von guter Metabolisierbarkeit, niedriger beziehungsweise gar keiner Toxizität und hoher Stabilität, sowie einen Zugang zu einfach durchführbaren Synthesewegen.
- 10 Der besondere Wert der erfindungsgemäßen Lipide liegt in ihrer Stabilität in Lösung, bei gleichzeitiger Metabolisierbarkeit durch die Zelle, da die Lipide zu einem wesentlichen Anteil aus Amidverknüpfungen aufgebaut sind.

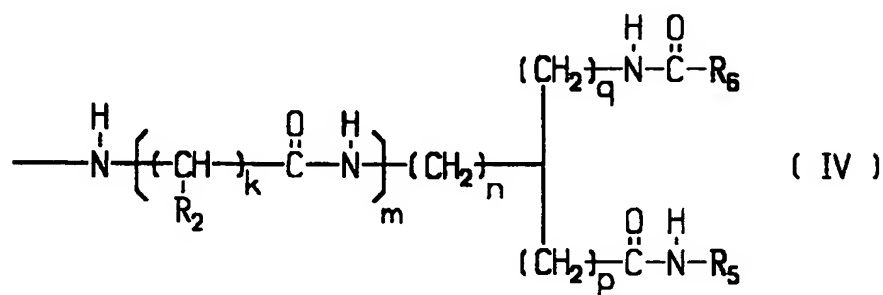
Von ganz besonderem Interesse sind Lipopolyamine der Formel I, worin $a, d, e = 3$, $b, f = 1$ und $c = 0$ sind.

Von ganz besonderem Interesse sind außerdem Verbindungen der Formel I, wobei $a, d, e = 3$, $b, f = 1$ und $c = 0$ sind, R_1 die Formel II aufweist, wobei die Reste und Indizes wie vorstehend definiert sind und direkt oder über einen Spacer, wie zum Beispiel Aminosäuren, verknüpft sein können. Dies entspricht Verbindungen der Formel II, wobei $h = 0$ oder 1, g (falls $h = 1$ ist) 1,2,3,4,5 oder 6, $R_2 =$ Wasserstoff, Methyl, 2-Propyl, Isopropyl, 1-(1-Methyl-) propyl oder Benzyl und

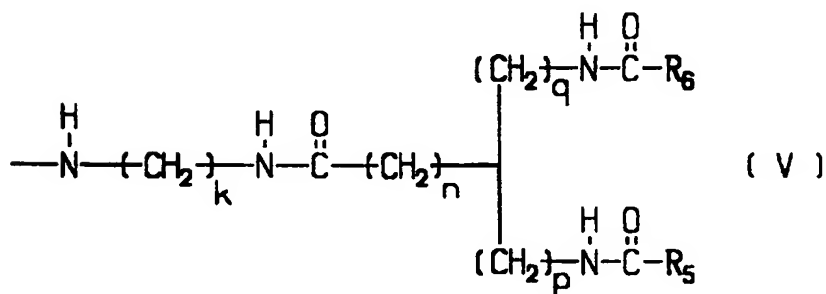




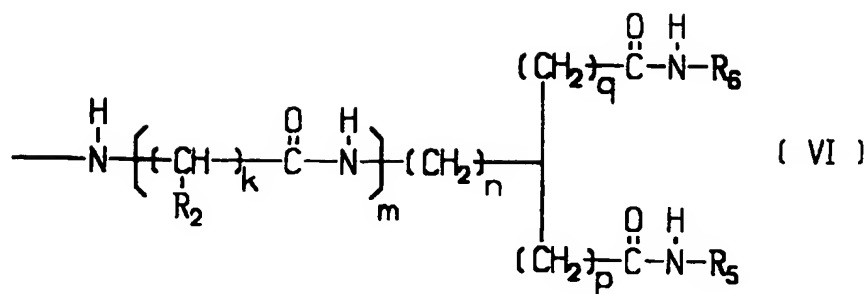
- Weiterhin von besonderem Interesse sind Verbindungen der Formel I, wobei a, d, e = 3 ,
 5 b, f = 1 und c = 0 ist und die allgemeine Formel IV, V oder VI aufweist:



- oder
 10



- oder
 15



Von ganz besonderem Interesse sind dabei solche Verbindungen, in denen das Grundgerüst der Lipidkomponente, welche die Formel IV, V oder VI aufweist, aus natürlich vorkommenden Aminosäuren besteht, wie zum Beispiel Ornithin, Glutaminsäure oder Asparaginsäure, an die zwei von natürlich vorkommenden Fettsäuren, zum Beispiel Ölsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Myristoylsäure etc., abgeleitete Alkylketten über Peptidbindungen verknüpft sind. Die Lipidkomponente kann wiederum direkt oder über einen Spacer an den Polyamin-Rest, welcher der Formel I entspricht, wobei $a, d, e = 3$, $b, f = 1$ und $c = 0$ ist, gebunden sein.

Dies bedeutet in Formel IV, daß $n = 0$, $m = 0$ oder 1 , für $m = 1$ und $k = 1$ der Spacer ebenfalls aus einer natürlich vorkommenden Aminosäure aufgebaut ist, so daß $R_2 =$ Wasserstoff, Methyl, 2-Propyl, Isopropyl, 1-(1-Methyl-) propyl oder Benzyl sein kann, für $m = 1$ und $k = 2, 3, 4, 5$, oder 6 der Spacer die Verbindungen Homoalanin, Aminocaprinsäure usw. darstellen kann, $q = 3$, und $p = 0$, $R_5 = \text{---}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ und $R_6 = \text{---}(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ sein kann.

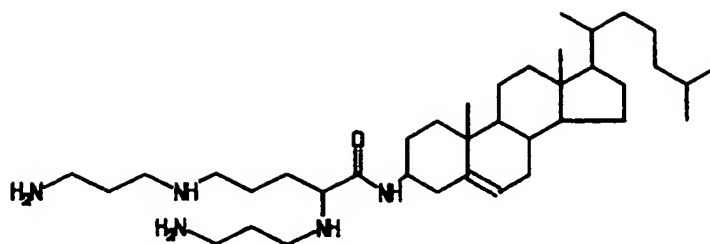
Dies bedeutet in Formel V, daß $n = 0$, $p = 3$, $q = 0$, $k = 2, 3, 4, 5$ oder 6 , der Spacer somit aus einer Diaminokomponente, wie Ethylendiamin, Propylendiamin, Butylendiamin, Diaminopentan, Diaminohexan, besteht, R_5 und $R_6 = \text{---}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ sein kann.

Dies bedeutet für Formel VI, daß $n = 0$, $m = 0$ oder 1 , $q = 0$, $p = 0, 1$ oder 2 , $k = 1$ (falls $m = 1$) $R_2 =$ Wasserstoff, Methyl, 2-Propyl, Isopropyl, 1-(1-Methyl-) propyl oder Benzyl sein kann, für $m = 1$ und $k = 2, 3, 4, 5$ oder 6 der Spacer die Verbindungen Homoalanin, Aminocaprinsäure usw. darstellen kann, R_5 und $R_6 = \text{---}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ ist.

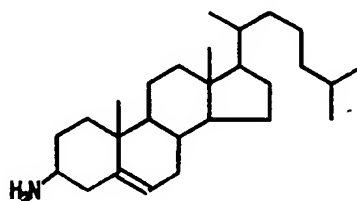
Nachstehend werden allgemeine Synthesewege der folgenden ganz besonders interessanten Verbindungen erläutert.

Zunächst zwei Verbindungen, die durch die Formeln I und II gekennzeichnet sind.

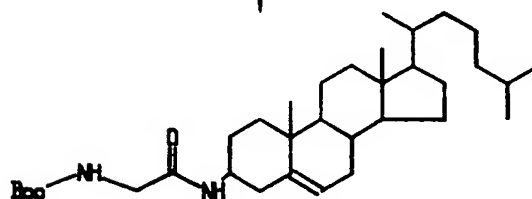
Als Ausgangsverbindung dient in beiden Fällen 5-Cholesten-3-amin, wobei durch allgemein bekannte Peptidverknüpfungsmethoden einerseits über die Spacer-Gruppe Glycin, 5 andererseits direkt der Sperminrest an die Aminofunktion der Ausgangsverbindung gebunden wird. Als Endprodukte erhält man N-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentyl] cholesteryl-3-amid und N-(2,5-Bis (3-aminopropyl) amino)-1-oxopentylglycylcholesteryl-3-amid.



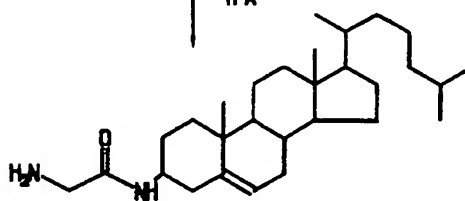
1) Tetra-Boc-ACP / DCCl
2) TFA



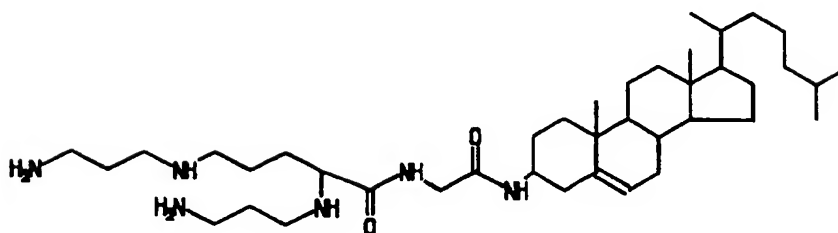
N-Boc-Gly
DCCl



TFA



1) Tetra-Boc-ACP / DCCl
2) TFA



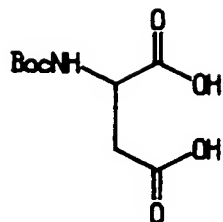
Desweiteren sind in diesem Zusammenhang solche Verbindungen von besonderem Interesse, die aus Kombinationen folgender Steroid-Grundgerüste und Spacer bestehen:

- 5 a) Steroidgrundgerüste: Cholesterin-3-amin, Lanosterin-3-amin, Campesterin-3-amin,
Stigmast-5-en-3-amin, Stigmasta-5,22-dien-3-amin.
b) Spacer: Glycin, Alanin, β -Alanin, 4-Aminobuttersäure, 5-Aminopentansäure,
6-Aminocaprinsäure, 7-Aminoheptansäure.

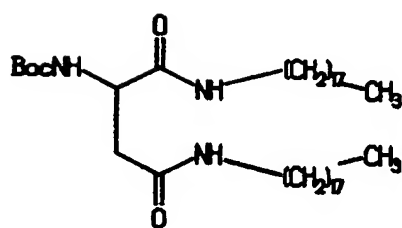
Das nächste Beispiel beschreibt die Synthese eines Lipopolyamids, welche durch die
10 Formeln I und VI gekennzeichnet ist:

Als Edukt wird Asparaginsäure eingesetzt, welche über allgemein bekannte Peptidverknüpfungsmethoden an den Carboxyfunktionen, in diesem Falle jeweils mit Stearylamin und nach der Entschützung der Aminofunktion direkt an 2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-carboxypentyl-Rest gebunden wird. Als Endprodukt erhält man N-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentylasparagyl]distearylamid
15

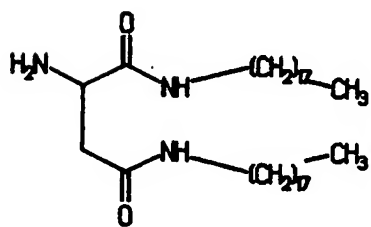
13



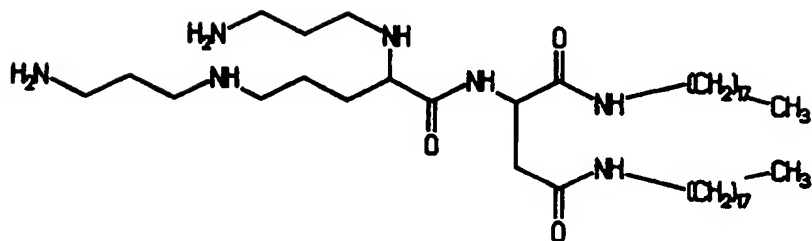
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2$
DCCI



TFA



1) Tetra-Boc-ACP / DCCI
2) TFA



Desweiteren sind in diesem Zusammenhang solche Verbindungen von besonderem Interesse, die aus Kombinationen folgender Aminosäure-Grundgerüste, Spacer und Aminen, deren Alkylrest sich aus den folgenden aufgelisteten Fettsäuren ableitet, bestehen:

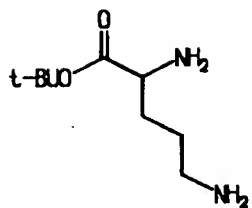
- a) Aminosäuregrundgerüste: Asparaginsäure, Glutaminsäure, α -Aminomalonsäure.
- 5 b) Spacer: Glycin, Alanin, β -Alanin, 4-Aminobuttersäure, 5-Aminopentansäure, 6-Aminocapronsäure, 7-Aminoheptansäure.
- c) Fettsäuren: Ölsäure, Palmitinsäure, Myristinsäure, Stearinsäure, Laurinsäure, Palmitoleinsäure, Linolensäure, Linolsäure, Arachidonsäure, Arachinsäure, Lignocerinensäure.

10

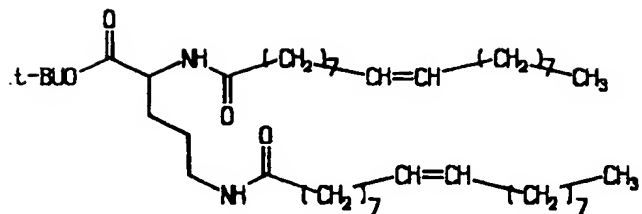
- Im nächsten Beispiel wird die Synthese einer weiteren Verbindung vorgestellt, welche durch die Formel I und V gekennzeichnet ist. Hierbei wird als Grundgerüst die an der Carboxyfunktion als tert-Butylester geschützte α -Aminosäure Ornithin eingesetzt. Eben-
- 15 falls durch allgemein bekannte Peptidverknüpfungsmethoden wird jene Verbindung in diesem Falle mit Ölsäure und nach der Entschützung der Carboxyfunktion über den Spacer Ethylendiamin an 2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-carboxypentyl-Rest gebunden. Als Endprodukt erhält man N-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentyl]-N'-[(N- α -,N- δ -dioleoyl)ornithyl]ethylen-diamin.

20

15

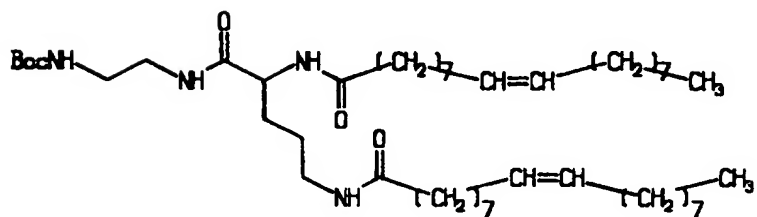


Ölsäure / DCCl



1) TFA

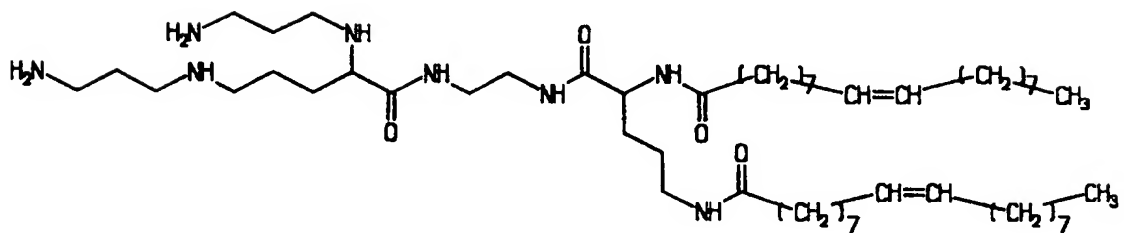
2) N-Boc-Ethylendiamin / DCCl



1) TFA

2) Tetra-Boc-ACP / DCCl

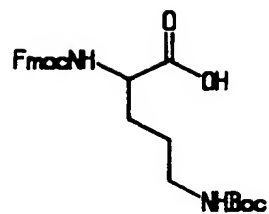
3) TFA



Desweiteren sind in diesem Zusammenhang solche Verbindungen von besonderem Interesse, die aus Kombinationen folgender Aminosäure-Grundgerüste, Spacer und den aufgelisteten Fettsäuren bestehen:

- 5 a) Aminosäuregrundgerüste: Lysin, Ornithin.
b) Spacer: Ethylendiamin, Propylendiamin, Butylendiamin, Pentamethylendiamin,
Hexamethylendiamin.
c) Fettsäuren: Ölsäure, Palmitinsäure, Myristinsäure, Stearinsäure, Laurinsäure,
Palmitoleinsäure, Linolensäure, Linolsäure, Arachidonsäure, Ara-
10 chinsäure, Lignocerinsäure.

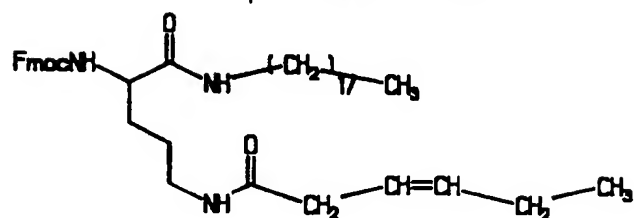
Im nächsten Beispiel, welches die Synthese einer Verbindung, charakterisiert durch die Formel I und IV, beschreibt, wird als Grundkörper wiederum die α -Aminosäure Ornithin verwendet, wobei die α -Aminofunktion durch die basenlabile Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe und die δ -Aminofunktion durch die bekannterweise säurelabile tert-Butoxycarbonyl-Gruppe geschützt sind. Durch allgemein bekannte Peptidverknüpfungsmethoden wird zunächst die α -Carboxyfunktion mit Stearylamin, dann nach Entschützung der δ -Aminofunktion jene mit Ölsäure und im darauffolgenden Schritt die α -Aminogruppe nach deren Entschützung direkt mit der Polyaminkomponente gekennzeichnet durch den 2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-carboxypentyl-Rest gekuppelt. Als
20 Endprodukt erhält man N- α -[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentyl]-N- δ -oleoyl-ornithylstearylamid



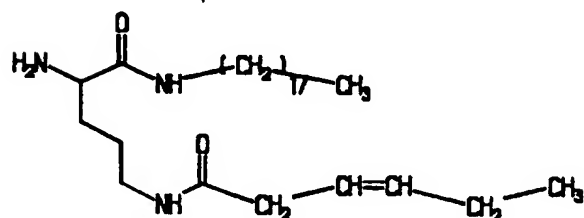
1) Stearoylamin / DCCl

2) TFA

3) Olefine / DCCl

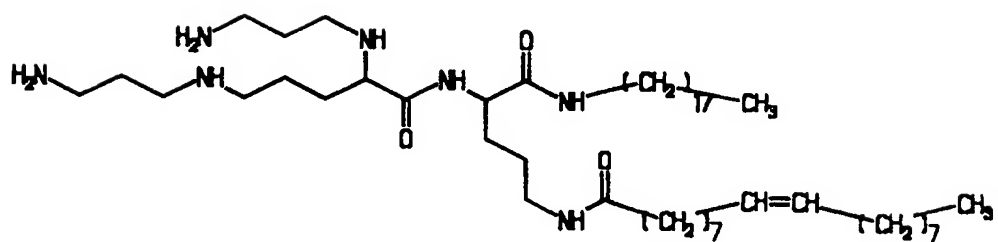


Base



1) Tetra-Boc-ACP / DCCl

2) TFA

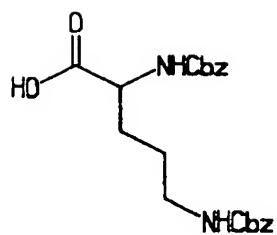


Desweiteren sind in diesem Zusammenhang solche Verbindungen von besonderem Interesse, die aus Kombinationen folgender Aminosäure-Grundgerüste, Spacer, Aminen, deren Alkylrest sich aus den folgenden aufgelisteten Fettsäuren ableitet, und den Fettsäuren als solche bestehen:

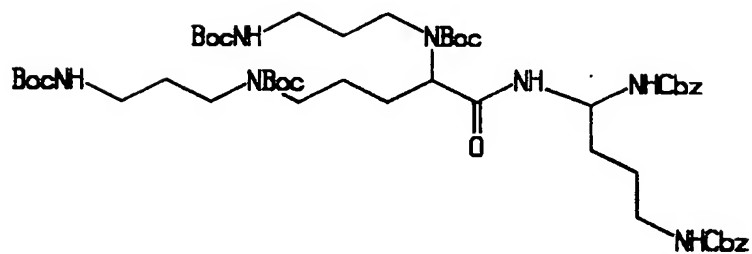
- a) Aminosäuregrundgerüste: Ornithin, Lysin
- b) Spacer: Glycin, Alanin, β -Alanin, 4-Aminobuttersäure, 5-Aminopentansäure, 6-Aminocapronsäure, 7-Aminoheptansäure.
- c) Fettsäuren: Ölsäure, Palmitinsäure, Myristinsäure, Stearinsäure, Laurinsäure, Palmitoleinsäure, Linolensäure, Linolsäure, Arachidonsäure, Arachidinsäure, Lignocerinsäure.

Als letztes Beispiel wird die Synthese einer Lipopolyamin-Verbindung ausgeführt, welche in der Formel I und III enthalten ist. Als Grundgerüst dient hier die an beiden Aminofunktionen durch die allgemein angewendete Benzyloxycarbonylgruppe geschützte α -Aminosäure Ornithin. Zunächst wird über Curtius-Abbau die Carboxyfunktion in die primäre Aminfunktion übergeführt, welche mit an den Aminofunktionen des pergeschützten 2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-carboxypentyl-Restes über allgemein bekannte Peptid-verknüpfungsmethoden gekuppelt wird. Nach Entschützung der Aminofunktionen werden jene nach gleicher Methodik jeweils mit Ölsäure verknüpft. Als Endprodukt erhält man 1,4-Dioleoylamido-1-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentyl] amidobutan

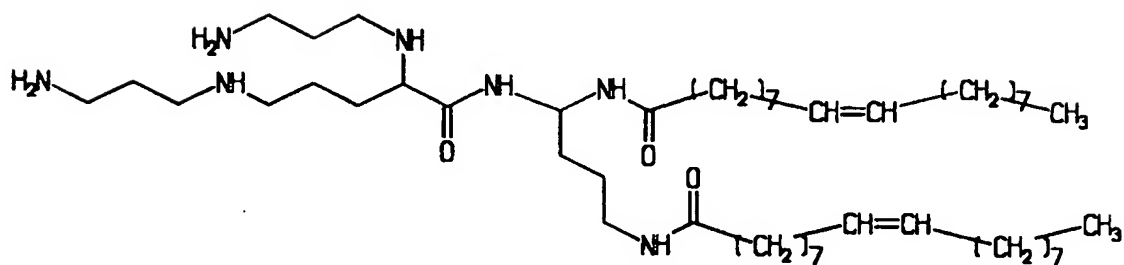
19



- 1) SOCl_2 / Base
- 2) NaN_3 / PTC
- 3) H_2O
- 4) Tetra-Boc-ACP / DCCI



- 1) 5% Pd/C + H_2
- 2) Säure / DCCI
- 3) TFA



Desweiteren sind in diesem Zusammenhang solche Verbindungen von besonderem Interesse, die aus Kombinationen folgender Aminosäure-Grundgerüste, Spacer und den aufgelisteten Fettsäuren bestehen:

- 5 a) Aminosäuregrundgerüste: Lysin, Ornithin.
- b) Spacer: Ethylendiamin, Propylendiamin, Butylendiamin, Pentamethylendiamin, Hexamethylendiamin.
- c) Fettsäuren: Ölsäure, Palmitinsäure, Myristinsäure, Stearinsäure, Laurinsäure, Palmitoleinsäure, Linolensäure, Linolsäure, Arachidonsäure, Ara-
- 10 chinsäure, Lignocerinsäure.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können als solche in wässriger oder wässriger Puffer- oder ethanolischer Lösung angewendet werden. Es können jedoch auch Liposo-

15 men mit oben genannten Lipiden allein, oder in Kombination mit anderen Lipiden wie zum Beispiel Cholesterol, Cholesterylamin, Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) oder Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) formuliert werden.

Um die Transfektionseffizienz der erfindungsgemäßen Lipide zu steigern, besteht die Möglichkeit, Zellen in Gegenwart von Substanzen zu transfektieren, die die enzymati-

20 sche Aktivität in den Lysosomen inhibieren, sogenannte lysosomatotrope Substanzen, wie zum Beispiel Chloroquin oder von Viren abgeleitete lysosomatropisch wirkende Proteine.

Die erfindungsgemäßen Lipopolyamine sind bei physiologischem pH positiv geladen und können daher mit negativ geladenen Makromolekülen, insbesondere mit DNA und ver-

25 wandten Stoffklassen stabile Aggregate bilden. Die mit den Lipopolyaminen bemantelten und positivierten Makromoleküle wechselwirken mit der negativ geladenen Zellmembran auf eine Weise, die zu einer Einschleusung der Makromoleküle in die Zelle führt. Dabei sind in vitro als auch in vivo Anwendungen möglich. Analoges gilt für Liposomenformulierungen der erfindungsgemäßen Lipide.

30 Im Vergleich zur zielgerichteten rezeptorvermittelten Endocytose (Wu et al., J. Chem. 262, 4429-4432 (1987)), in denen Polykationen, welche auch DNA-Binder genannt werden (zum Beispiel Polylysin etc.) an sogenannte Internalisierungsfaktoren (zum Beispiel bestimmte Glykoproteine) gebunden sind, die zielgerichtet an Oberflächenrezepto-

ren bestimmter Zellen binden, besitzen die erfindungsgemäßen Lipide, bzw. deren Liposomenformulierungen keine Zellspezifität. Eine zielgerichtete Lieferung durch die erfindungsgemäßen Lipide bzw. derer Liposomenformulierungen kann dadurch erreicht werden, daß die Ladungen von Lipiden und den zu transportierenden Biomolekülen ausgeglichen werden und zusätzlich an das Aggregat zwischen Biomolekül und Lipiden Internalisierungsfaktoren angebracht werden. Dies kann zum Beispiel durch Liposomenformulierung mit Colipiden erreicht werden, falls die Colipide als Kopfgruppe solche Internalisierungsfaktoren tragen. Eine andere Möglichkeit ist ein auf Ladungsneutralität abgestimmtes Aggregat aus Biomolekül, Lipiden und Internalisierungsfaktoren. Sogenannte Internalisierungsfaktoren sind Transferrin, Galactose, Mannose, Mannose-6-phosphat, Asialglycoprotein, Conalbumin, Lectine, Transcobalamin, α -2-Makroglobulin, Biotin, Folat, mannosylierte Glycoproteine. Weitere sind in EP 0535576, EP 0544292, WO 9421808 zu entnehmen, die hierin unter Bezugnahme aufgenommen werden.

Analog wie Internalisierungsfaktoren, können auch zellspezifische Antikörper eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können zu Therapie Zwecken eingesetzt werden. Insbesondere können solche Verbindungen für die Gentherapie von zum Beispiel Cystischer Fibrose, Muskeldystrophie, Phenylketonurie, Ahornsirupkrankheit, Propionazidämie, Methylmalonazidämie, Adenosindeaminasemangel und Hypercholesterinämie, Hämophilie, β -Thalassämie genutzt werden. Gentherapeutische Behandlungsmethoden sind weiters interessant, wenn Hormone, Wachstumsfaktoren, Cytotoxine oder immunomodulierend wirkende Proteine im Organismus synthetisiert werden sollen. Für die oben genannten Zwecke können DNA-Fragmente mittels dieser Lipide in Zellen gebracht werden, in denen diese DNA die gewünschte Wirkung entfalten soll. Die gewünschte Wirkung kann der Ersatz fehlender oder defekter DNA-Bereiche oder die Inhibition von DNA-Bereichen (zum Beispiel Antisense-DNA / RNA), die die Erkrankung auslösen, im erkrankten Zelltyp sein. Auf diese Weise können tumorunterdrückende Gene in der Krebs-Therapie eingesetzt werden oder durch die Einführung cholesterolregulierender Gene eine Beitrag zur Vorbeugung von Herz- und Blutgefäßkrankheiten geleistet werden. Weiters können DNA, welche Ribozyme kodiert, oder Ribozyme selbst in erkrankte Zellen eingeschleust werden. Die Translation jener DNA erzeugt aktive Ribozyme, die an spezifischen Stellen m-RNA katalytisch spalten und auf diese Weise die Transkription verhindern. Auf diese Weise kann zum Beispiel virale m-

RNA gespalten werden, ohne eine andere zelluläre m-RNA in Mitleidenschaft zu ziehen. Der Vermehrungszyklus von Viren (HIV, Herpes, Hepatitis) kann auf diesem Wege unterbrochen werden.

- 5 Auch in der Krebstherapie spielt Transfektion zur Herstellung von Krebsvakzinen eine immer größer werdende Rolle. Damit ist jene auch mögliches Anwendungsgebiet für die erfindungsgemäßen Verbindungen.

- Eine weitere Anwendung können solche Lipide zum Beispiel in Impff Verfahren finden, die auf der Basis der Expression von DNA, welche immunogene Peptide kodiert, im Körper von Mensch und Tier funktionieren. Dazu werden Lipid / DNA-Komplexe als
10 Impfstoffe benutzt. Die Einschleusung der DNA in die Körperzellen führt zur Expression des immunogenen Peptids und löst somit die Immunantwort aus.

- Abgesehen von DNA können auch andere Makromoleküle, wie zum Beispiel Peptide oder Proteine, in Zellen eingeschleust werden. Zu diesem Zweck können sie mit den erfindungsgemäßen Lipopolyaminen als solche bemäntelt werden oder in Liposomen,
15 welche als Komponente die erfindungsgemäßen Lipopolyamine enthalten, eingeschlossen oder an deren Oberfläche adsorbiert werden. Bringt man derartige Aggregate mit Zellen in Kontakt, so findet ein Transport dieser Moleküle durch die Zellwand statt. Therapeutische Peptide haben einen günstigen Einfluß auf zahlreiche Erkrankungen. Solche Peptide oder Proteine sind zum Beispiel Lymphokine, Interleukine, Tumore Ne-
20 krose Faktoren oder Interferone, weiterhin Wachstumsfaktoren, Gewebeplasminogen-aktivator, Faktor-VIII:c, Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, Erythropoietin, Insulin, Calcitonin, Thymidinkinase und andere. Auch toxische Peptide wie Ricin, Diphtheriatoxin und andere können therapeutisch gewinnbringend eingesetzt werden.

- 25 Die Lipide werden aufgrund ihrer positiven Ladung vorwiegend dazu eingesetzt, negativ geladene Moleküle wegen ihrer negativen Ladung zu komplexieren und in Zellen einzuschleusen. Durch sogenannte „self assembling systems“ können jedoch auch positiv geladene Moleküle transportiert werden, in dem zunächst negativ geladene Liposomen mit diesem positiv geladenen Molekülen komplexiert werden. Wählt man die Verhältnisse
30 so, daß eine negative Nettoladung verbleibt, können diese Komplexe mit diesen erfindungsgemäßen Lipopolyaminen als solche oder in Form von Liposomen positiviert werden, in dem die gegensätzlich geladenen Komponenten in Kontakt gebracht werden. Die

resultierenden positiv geladenen Gesamtkomplexe werden von den Zellen aufgenommen.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten für kationische Lipide sind den Veröffentlichungen WO 9011092, WO 9116024, WO 9303768, Science 258, 744-746 (1992) zu entnehmen, die hierin unter Bezugnahme aufgenommen werden.

Beispiele der für derzeit als für therapeutisch aussichtsreich angesehene Sequenzen für genetisches Material sind in der Übersicht von F.W.Anderson, Science 256, 808 (1992) entnehmbar, die ebenfalls hierin unter Bezugnahme aufgenommen werden.

10

Beispiele:

Bezugsquellen:

1. Plasmide pCH110 (enthält β -Gal als Reportergen) und pMSGCAT: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

15

L-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino]-tetra-tert-butyloxy-carboxy-1-oxopentan (tetra-BOC-ACP) wurde nach J.-P. Behr et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, pp. 6982-6986, (1998) synthetisiert.

5-Cholesten-3-amin wurde nach H. Brunner, G. Sperl; Bull. Soc. Chim. Belg. 101, 935 (1992) synthetisiert.

20

Beispiel 1:

Synthese von N-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentyl] cholesteryl-3-amid

Zu einer Lösung von 647 mg (1 mmol) L-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino]-tetra-tert-butyloxy-carboxy-1-oxopentan und 385 mg (1 mmol) 5-Cholesten-3-amin in 10 ml THF (Tetrahydrofuran) oder DMF (N,N-Dimethylformamid) werden 206 mg (1 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) gegeben. Die Reaktion wird bei Raumtemperatur (RT) unter Rühren des Reaktionsgemisches durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 12 h wird von ausgefallenem Dicyclohexylharnstoff (DCH) abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird durch Flashchromatographie gereinigt.

30

Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines Trifluoressigsäure (TFA)/CH₂CH₂-Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren wird überschüssiges

TFA/CH₂CH₂ abgezogen. Das TFA-Salz des Endproduktes kann durch gesättigte, wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung in das freie Amin übergeführt werden.

Beispiel 2:

5 Synthese von N-(2,5-Bis (3-aminopropyl) amino)-1-oxopentylglycylcholesteryl-3-amid.

Zu einer Lösung von 175 mg (1 mmol) N-Boc-Glycin und 385 mg (1 mmol) 5-Cholesten-3-amin in 10 ml THF oder DMF werden 206 mg (1 mmol) DCCI gegeben und bei RT 12 h gerührt. Danach wird von ausgefallenem DCH abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird durch Flashchromatographie gereinigt.

- 10 Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines TFA/CH₂CH₂ - Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren des Gemisches wird überschüssiges TFA/CH₂CH₂ abgezogen. Das TFA-Salz des geschützten Vorläuferproduktes wird durch gesättigte, wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung in das freie Amin übergeführt. Danach wird zusammen mit 647 mg (1 mmol) L-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino]-
- 15 tetra-tert-butyloxy-carboxy-1-oxopentan in 10 ml THF oder DMF aufgenommen und die Lösung mit 206 mg (1 mmol) DCCI versetzt und bei RT für 12 h gerührt. Danach wird das ausgefallene DCH abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird durch Flashchromatographie gereinigt.

- Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines TFA/CH₂CH₂ -
- 20 Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren wird überschüssiges TFA/CH₂CH₂ abgezogen. Das TFA-Salz des Endproduktes kann durch gesättigte, wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung in das freie Amin übergeführt werden.

Beispiel 3:

25 Synthese von N-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentylasparagyl]distearylamid

Zu einer Lösung von 233 mg (1 mmol) N-Boc-Asparaginsäure und 540 mg (2 mmol) Stearylamin in 10 ml THF oder DMF werden 412 mg (2 mmol) DCCI gegeben. Die Reaktion wird bei RT und Rühren des Reaktionsgemisches durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 12 h wird von ausgefallenem DCH abfiltriert und das Lösungsmittel

30 abgezogen. Das erhaltene Produkt wird mittels Flashchromatographie gereinigt.

Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines TFA/CH₂CH₂ - Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren wird überschüssiges TFA/CH₂CH₂ abgezogen. Das TFA-Salz des geschützten Vorläuferproduktes wird durch gesättigte, wässrige Na-

triumhydrogencarbonatlösung in das freie Amin übergeführt. Danach wird zusammen mit 647 mg (1 mmol) L-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino]-tetra-tert-butyloxy-carboxy-1-oxopentan in 10 ml THF oder DMF aufgenommen und die Lösung mit 206 mg (1 mmol) DCCI versetzt. Die Reaktion wird wiederum bei RT und unter Rühren ausgeführt und nach einer Reaktionszeit von 12 h wird von ausgefallenem DCH abfiltriert und die Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird durch Flashchromatographie gereinigt.

Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines TFA/CH₂CH₂ - Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren wird überschüssiges TFA/CH₂CH₂ abgezogen. Das TFA-Salz des Endproduktes kann durch gesättigte, wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung in das freie Amin übergeführt werden.

Beispiel 4:

Synthese von N-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentyl]-N'-[(N-α-,N-δ-dioleoyl)-ornithyl]ethylendiamin

Zu einer Lösung von 455 mg (1 mmol) Ornithin-OtBu und 566 mg (2 mmol) Ölsäure in 10 ml THF oder DMF werden 412 mg (2 mmol) DCCI gegeben. Die Reaktion wird bei RT 12 h lang gerührt. Danach wird von ausgefallenem DCH abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird mittels Flashchromatographie gereinigt.

Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung wird bei RT eine 95 %ige wässrige Lösung von TFA gegeben. Nach 2 h Rühren wird von überschüssigem TFA/H₂O abgezogen. Danach wird zusammen mit 160 mg (1 mmol) N-Boc-Ethylendiamin in 10 ml THF oder DMF aufgenommen und die Lösung mit 206 mg (1 mmol) DCCI versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei RT gerührt und nach einer Reaktionszeit von 12 h von ausgefallenem DCH abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird durch Flashchromatographie gereinigt.

Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines TFA/CH₂CH₂ - Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren wird von überschüssigem TFA/CH₂CH₂ abgezogen. Das erhaltene TFA-Salz wird durch gesättigte, wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung in das freie Amin übergeführt. Danach wird zusammen mit 647 mg (1 mmol) L-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino]-tetra-tert-butyloxy-carboxy-1-oxopentan in 10 ml THF oder DMF aufgenommen und die Lösung mit 206 mg (1 mmol) DCCI versetzt.

- Nach 12 h Rühren bei RT wird von ausgefallenem DCH abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird mittels Flashchromatographie gereinigt.
- Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines TFA/CH₂CH₂ - Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren wird überschüssiges TFA/CH₂CH₂ abgezogen.
- 5 Das TFA-Salz des Endproduktes kann durch gesättigte, wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung in das freie Amin übergeführt werden.

Beispiel 5:

Synthese von N- α -[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentyl]-N- δ -oleoylornithylste-
10 arylamid

- Zu einer Lösung von 455 mg (1 mmol) N- α -Fmoc-N- δ -Boc-Ornithin und 270 mg (1 mmol) Stearylamin in 10 ml THF oder DMF werden 206 mg (1 mmol) DCCI gegeben. Der bei RT und unter Rühren durchgeführte Reaktionsansatz wird nach einer Reaktionszeit von 12 h vom ausgefallenem DCH filtriert und das Lösungsmittel abgezogen.
- 15 Das erhaltene Produkt wird mittels Flashchromatographie gereinigt.
- Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines TFA/CH₂Cl₂ - Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren wird überschüssiges TFA/CH₂Cl₂ abgezogen. Danach wird zusammen mit 283 mg (1 mmol) Ölsäure in 10 ml THF oder DMF aufgenommen und die Lösung mit 206 mg (1 mmol) DCCI versetzt. Nach 12 h Rühren bei
- 20 RT wird von ausgefallenem DCH abfiltriert und die Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird durch Flashchromatographie gereinigt.
- Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung wird bei RT eine Lösung von 10 % Diethylamin in DMF zugegeben. Nach Einengen im Vakuum und Reinigung durch Flashchromatographie wird das erhaltene Produkt zusammen mit 647 mg (1 mmol) L-[2,5-Bis (3-
- 25 aminopropyl) amino]-tetra-tert-butyloxy-carboxy-1-oxopentan in 10 ml THF oder DMF aufgenommen und die Lösung mit 206 mg (1 mmol) DCCI versetzt. Nach 12 h Rühren bei RT wird von ausgefallenem DCH abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird mittels Flashchromatographie gereinigt.
- Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines TFA/CH₂CH₂ -
- 30 Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren wird überschüssiges TFA/CH₂CH₂ abgezogen. Das TFA-Salz des Endproduktes kann durch gesättigte, wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung in das freie Amin übergeführt werden.

Beispiel 6:

Synthese von 1,4-Dioleoylamido-1-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino-1-oxopentyl] amido-
butan

- Zu einer Lösung von 400 mg (1 mmol) N- α -N- δ -di-CBz-Ornithin in 20 ml CH₂Cl₂ werden 140 μ l NEt₃ und 119 mg SOCl₂ tropfenweise zugegeben, wobei das Reaktionsgemisch 0°C nicht übersteigen sollte. Nach Erwärmen des Gemisches auf RT werden 0.33-0.65 g NaN₃ (5-10 facher Überschuß) zusammen mit Tetra-n-Butylammoniumhydrogensulfat (10 mol% bezüglich Edukt) zugegeben. Nach ca. 6 h unter Rückfluß wird mit gesättigter, wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser mehrmals gewaschen. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Flashchromatographie gereinigt.
- Das erhaltene Produkt wird zusammen mit 647 mg (1 mmol) L-[2,5-Bis (3-aminopropyl) amino]-tetra-tert-butyloxy-carboxy-1-oxopentan in 10 ml THF oder DMF aufgenommen und die Lösung mit 206 mg (X mmol) DCCI versetzt. Nach 12 h Rühren bei RT wird von ausgefallenem DCH abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird durch Flashchromatographie gereinigt.
- Nach Abspaltung der Cbz-Gruppen durch Hydrogenolyse bei RT und Rühren mit 5 % Pd auf Aktivkohle in Methanol wird das Lösungsmittel abgezogen, danach wird der Rückstand zusammen mit 565 mg (2 mmol) Ölsäure in 10 ml THF oder DMF aufgenommen und die Lösung mit 412 mg (2 mmol) DCCI versetzt. Nach 12 h Rühren bei RT wird von ausgefallenem DCH abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das erhaltene Produkt wird mittels Flashchromatographie gereinigt.
- Zu der erhaltenen gereinigten Verbindung werden bei RT 10 ml eines TFA/CH₂CH₂ - Gemisches zugegeben. Nach 2 h Rühren wird überschüssiges TFA/CH₂CH₂ abgezogen. Das TFA-Salz des Endproduktes kann durch gesättigte, wässrige Natriumhydrogencarbonatlösung in das freie Amin übergeführt werden.

Beispiel 7:

Liposomenformulierung

- Dioleoylphosphatidylethanolamin, Dioleoylphosphatidylcholin, Cholesterol und Cholesteryl-amin werden in einem organischen Lösungsmittel gelöst. Die Lipide aus den Beispielen 1-6 werden als solche oder in Form ihrer Salze, zum Beispiel Trifluoracetat-Salze in einem organischen Lösungsmittel gelöst. Durch Kombination verschiedener Mengen der unterschiedlichen Lösungen werden verschiedene Kompositionen aus ein-

- zelen Lipiden aus den Beispielen 1-6 oder Lipidgemische aus Colipiden und Lipiden aus den Beispielen 1-6 hergestellt. In einem Glaskolben wird mit Hilfe eines Rotationsverdampfers ein dünner Lipidfilm erzeugt. Dieser wird im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Der Film wird mit soviel Wasser oder wässriger Pufferlösung hydratisiert, daß die Konzentration 1mg Lipid pro ml Lösung beträgt. Danach wird unter Kühlung mit Ultraschall behandelt. Die Liposomenformulierung wird durch einem Filter (Porenweite 0.2 µm) sterilfiltriert.

10 Beispiel 8:

Lipidlösungen

Die Lipide aus den Beispielen 1-6 werden als solche und in Form ihrer TFA-Salze zu einer Konzentration von 1-2.5 mg/ml in Wasser, Ethanol und einem Gemisch aus Wasser und Ethanol verschiedener Zusammensetzung gelöst.

15

Beispiel 9:

Zellkulturen

- Die Zelllinien COS-7, Hela und BHK-21 werden in „Dulbecco's-modified Eagle's medium“ (DMEM), das 10% fötales Kälberserum (FBS), 2mM L-Glutamin (Gln), 0.1 mM nicht essentielle Aminosäuren (NEAA), 100U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthält, in einem Inkubator (5% CO₂- Atmosphäre) kultiviert.

Beispiel 10:

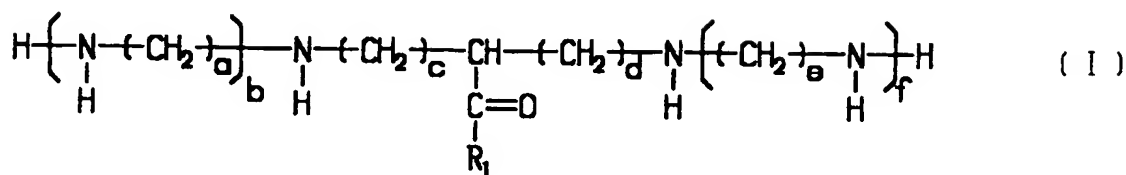
Transfektion

- 25 Die Zellen werden auf einer 96-well-Mikrotiterplatte ausplattiert und über Nacht zu annähernd 60 % Konfluenz inkubiert. Um die Zellen in einem „well“ zu transfizieren, werden 1-2 µg von pCH110 oder pMSGCAT in 100 µl Opti-MEM I gelöst. Das kationische Lipid als ethanolische Lösung oder Liposomenformulierung wird ebenfalls in 100 µl Opti-MEM I gelöst. Die beiden Lösungen werden in einem Polystyrolbehälter gemischt, für 10-15 min stengelassen, um die Bildung des Lipid/DNA-Komplexes zu ermöglichen. Danach wird auf 1 ml aufgefüllt indem 0.8 ml Opti-MEM I oder DMEM mit 5% FBS, 2 mM Gln, 0.5 mM NEAA ohne Antibiotika zugegeben werden.

- Die Zellen werden einmal mit Opti-MEM I oder serumfreien DMEM gewaschen und der DNA/Lipid-Komplex wird direkt zu den Zellen gegeben. Nach 6 h Inkubationszeit bei 37°C wird der Transfektionskomplex entfernt und 2 ml DMEM mit 10% FBS, 2 mM Gln, 0.2 mM NEAA, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zu jedem „well“
- 5 hinzugegeben. Die Zellen werden weitere 48 h kultiviert und durch ein bis zweimaliges Frieren und Tauen in 300 µl 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8-8.0), welches 0.1 % Triton X-100 enthält, lysiert. Die Zelllysate werden auf β-Galactosidase oder Chloramphenicolacetyltransferase getestet. Diese Tests werden mit kommerziell erhältlichen ELISA-Testkits nach den Anweisungen der Hersteller durchgeführt.

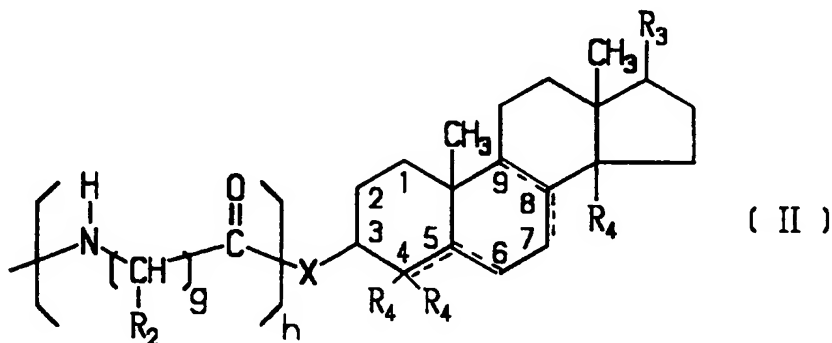
Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel I:



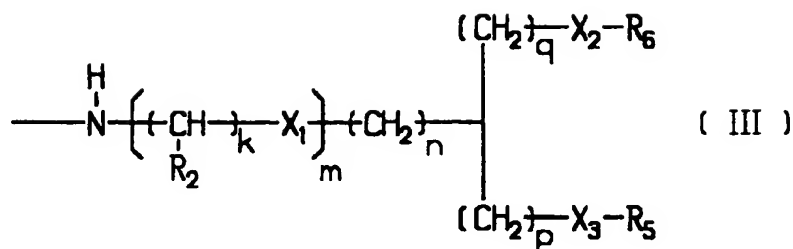
die bei Vorhandensein eines Asymmetriezentrums in der D-, L- oder DL-Form vorliegen, einschließlich ihrer Salze, wobei a, b, c, d, e und f unabhängig voneinander 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 sind und wobei a nur dann 0 ist, wenn b 0 ist, e nur dann 0 ist, wenn f 0 ist,

10 R_1 ein Rest der allgemeinen Formel II ist:

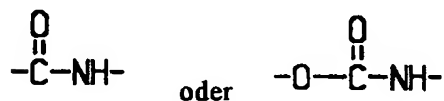


in welcher g 0,1,2,3,4,5 oder 6 ist, h 0,1,2 oder 3 ist, wobei g 0 ist, wenn h 0 ist und h 1 ist, wenn g 0 ist, X -O- oder -NH- ist, alle Positionen der Steroid-Substituenten α - oder β -konfiguriert sein können, die C-Atome 4 und 5 und/oder 5 und 6 und/oder 7 und 8 und/oder 8 und 9 über eine Doppelbindung verknüpft sind, mit der Maßgabe, daß die C-Atome 5 und 8 neben Einfachbindungen jeweils über höchstens eine Doppelbindung mit benachbarten Atomen verknüpft sind, R_2 und R_3 unabhängig voneinander Wasserstoff oder ein verzweigter oder unverzweigter Alkyl- oder ein verzweigter oder unverzweigter Alkenyl- oder ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Aralkylrest sind, R_4 H oder Methyl ist

oder R_1 ein Rest der allgemeinen Formel III ist:



- wobei alle chiralen Zentren unabhängig voneinander in D- oder L- Form vorliegen, m 0,1,2 oder 3 ist, k 0,1,2,3,4,5 oder 6 ist, wobei k 0 ist, wenn m 0 ist und m 1 ist, wenn k 0 ist, n, p und q unabhängig voneinander 0,1,2,3,4,5 oder 6 sind, R₂ wie vorstehend definiert ist, X₁, X₂, und X₃ unabhängig voneinander



sind,

10

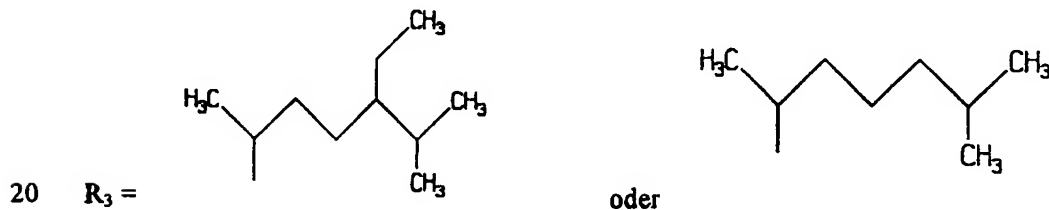
R₅ und R₆ unabhängig voneinander verzweigte oder unverzweigte Alkyl- oder Alkenylreste mit 5-30 Kohlenstoffatomen sind.

2. Verbindungen nach Anspruch 1, wobei a, d und e 3 sind, b und f 1 sind und c 0 ist.

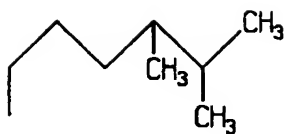
15

3. Verbindungen nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei h 0 oder 1 ist und g (falls h 1 ist) 1,2,3,4,5 oder 6 ist,

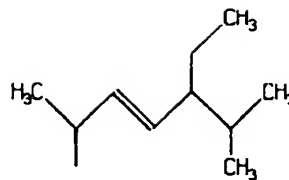
R₂ = Wasserstoff, Methyl, 2-Propyl, Isopropyl, 1-(1-Methyl-) propyl oder Benzyl und



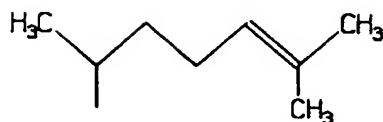
oder



oder



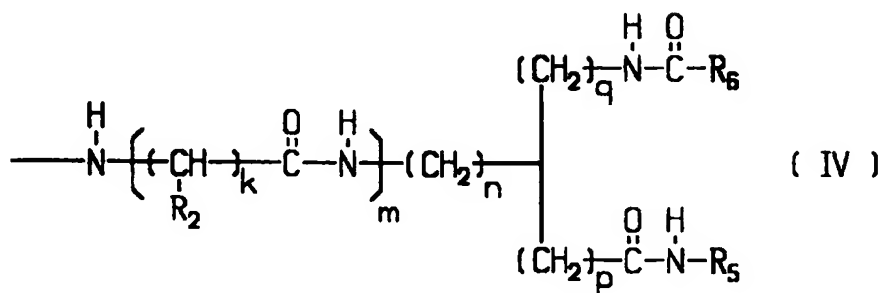
oder



ist.

5

4. Verbindungen nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin R_1 ein Rest der allgemeinen Formel IV ist:



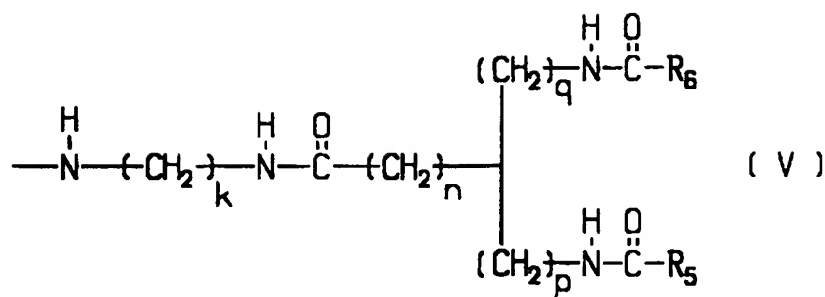
10

worin k, m, n, p, q, R_2, R_5 , und R_6 wie in Anspruch 1 definiert sind.

5. Verbindungen nach Anspruch 4, wobei $n = 0$, $m = 0$ oder 1, $q = 3$, und $p = 0$, k (falls $m = 1$) = 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, R_2 Wasserstoff, Methyl, 2-Propyl, Isopropyl, 1-(1-Methyl-) propyl oder Benzyl, $R_5 = -(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ und $R_6 = -(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ ist.

15

6. Verbindungen nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin R_1 ein Rest der allgemeinen Formel V ist:

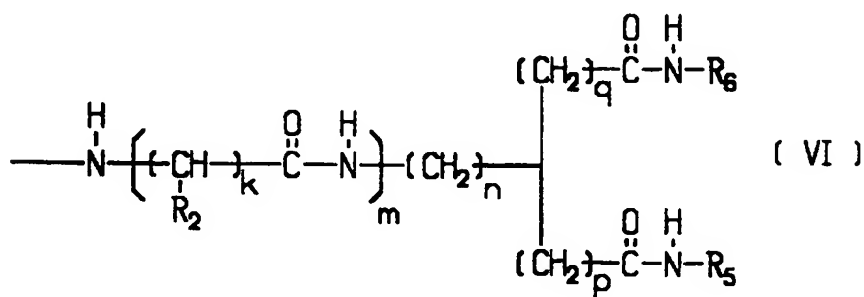


worin k 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 ist und n , p , q , R_5 und R_6 wie in Anspruch 1 definiert sind.

- 5 7. Verbindungen nach Anspruch 6, in denen $n = 0$, $p = 3$, $q = 0$, $k = 2, 3, 4, 5$ oder 6 ist, R_5 und $R_6 = -(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$ sind.

8. Verbindungen nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin R₁ ein Rest der allgemeinen Formel VI ist:

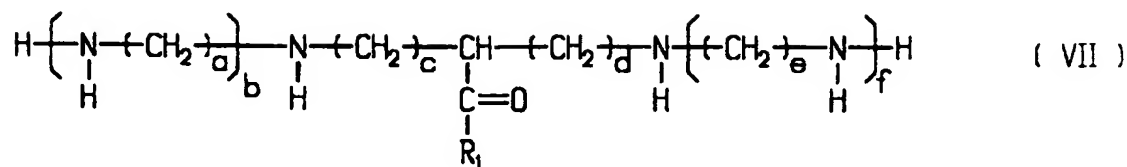
10



worin k, m, n, p, q, R_2, R_5 , und R_6 wie in Anspruch 1 definiert sind.

- 15 9. Verbindungen nach Anspruch 8, in denen n 0 ist, m 0 oder 1 ist, q 0 ist, p 0, 1 oder 2 ist, k 0 ist, wenn m 0 ist, k, falls m 1 ist, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 ist, R₂ = Wasserstoff, Methyl, 2-Propyl, Isopropyl, 1-(1-Methyl-) propyl oder Benzyl, R₅ und R₆ = -(CH₂)₁₇CH₃ ist.

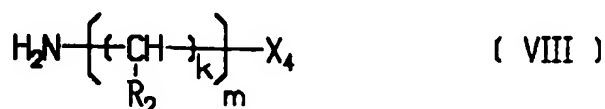
- 20 10. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei ein Polyaminderivat der Formel VII:



wobei a, b, c, d, e und f wie in Anspruch 1 definiert sind,

gegebenenfalls mit einem Spacer, der aus Aminoalkylensäurederivaten oder Diaminoalkylenderivaten der Formel VIII bestehen kann:

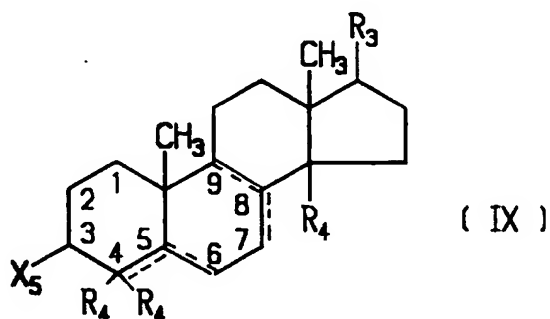
5



wobei k, m und R₂ wie in Anspruch 1 definiert sind und X₄ -COOH oder -NH₂ sein

10 kann,

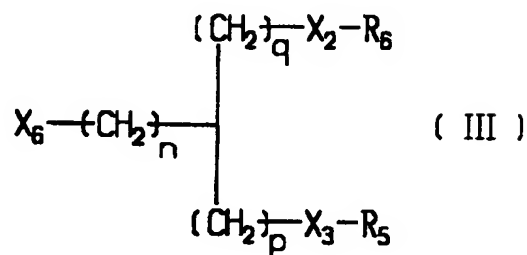
und mit einem Steroidgerüst der Formel IX:



15 wobei R₃ und R₄ wie in Anspruch 1 definiert sind, alle Positionen am Steroid-Grundgerüst α- oder β-konfiguriert sein können, die C-Atome 4 und 5 und/oder 5 und 6 und/oder 7 und 8 und/oder 8 und 9 über eine Doppelbindung verknüpft sind, mit der Maßgabe, daß die C-Atome 5 und 8 neben Einfachbindungen jeweils über höchstens eine Doppelbindung mit benachbarten Atomen verknüpft sind, X₅ -NH₂ oder -OH sein

20 kann,

oder einem trifunktionellen Grundgerüst der Formel X:



wobei n, p, q, X₂, X₃, R₅ und R₆ wie in Anspruch 1 definiert sind und X₆ -NH₂ oder -COOH entspricht, umgesetzt wird.

11. Liposomenformulierungen mit Verbindungen nach einem der Ansprüche 1-9 mit oder ohne Colipide.

10 12. Verfahren zum Einbringen von biologisch wirksamen Verbindungen, wie DNA, RNA, Ribozymen, Antisense-DNA, Antisense-RNA, Peptiden und Proteinen in eukariotische Zellen, wobei Verbindungen oder Formulierungen nach einem der Ansprüche 1-9 oder 11 mit den einzubringenden Verbindungen und die entstandenen Komplexe mit eukariotischen Zellen in vivo oder in vitro in Kontakt gebracht werden.

15

13. Verwendung der Verbindungen oder Formulierungen nach einem der Ansprüche 1-9 oder 11 als Reagenz zur Einbringung von biologisch wirksamen Verbindungen, wie DNA, RNA, Ribozymen, Antisense-DNA, Antisense-RNA, Peptiden und Proteinen in vivo oder in vitro in eukariotische Zellen.

20